

PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/19237>

Please be advised that this information was generated on 2020-11-24 and may be subject to change.

isbn: 90-9016717-x

Kernspins en Biomoleculen

Een kostbare Band

Door Prof. Dr. C.W. Hilbers

Kernspins en Biomoleculen

Een kostbare Band

Rede (in verkorte vorm) uitgesproken
bij het aftreden als hoogleraar
in de Fysische Chemie
aan de Katholieke Universiteit Nijmegen
op 16 januari 2003

Door Prof. Dr. C.W. Hilbers



Katholieke *Universiteit* Nijmegen

Voor Riet

Mijnheer de Rector Magnificus
Zeer geachte toehoorders

Het is nu iets meer dan 48 jaar geleden dat ik als 16-jarige het Koninklijke Shell Laboratorium te Amsterdam binnenstapte om daar met een aantal anderen te beginnen aan een opleiding tot laboratoriumassistent. Ik kwam daar in aanraking met de fascinerende wereld van wetenschap en onderzoek speciaal de chemie en fysische chemie, een wereld die ik tot op de dag van vandaag niet meer heb verlaten. In dit afscheidscollege hoop ik iets van deze fascinatie met u te kunnen delen. Ik heb daartoe de volgende opzet gekozen.

Omdat er vele misvattingen bestaan over wat scheikunde of chemie nu eigenlijk is, lijkt het mij goed er hier in het kort iets over te zeggen. Dit geeft mij tevens de gelegenheid een aantal begrippen kort toe te lichten, met name de ontwikkeling van het atoom- en molecuulbegrip. Vervolgens, na de introductie van het begrip kernspin, wil ik de methode van de kernmagnetische resonantie invoeren, die van belang is voor de rest van mijn lezing. Daarna zal ik u de ontwikkeling van deze methode schetsen in relatie tot de studie van biomacromoleculen.

Moleculen en atomen

Scheikunde is de wetenschap die zich bezighoudt met het bestuderen van alle facetten van het gedrag van moleculen. Het definiëren van het begrip molecuul is echter niet zo eenvoudig. Ik zou natuurlijk kunnen zeggen dat moleculen behoren tot de meest fascinerende deeltjes die op onze aarde voorkomen. Ik ben daar ook van overtuigd, maar een goede definitie is het niet. Je kunt je natuurlijk afvragen of dat erg is, ik denk het

niet. Als ik U zou vragen een definitie van de letter A te geven, vermoed ik dat ik U aardig in de moeilijkheden breng, zoals is geïllustreerd in Figuur 1. Ditzelfde geldt ook voor het molecuul begrip.



Figuur 1. *Verschillende representaties van de letter A, welke door ieder, die met het Latijnse alfabet is opgegroeid, gemakkelijk zijn te herkennen. Het is duidelijk dat het niet zo eenvoudig is een definitie van de letter A te geven. Een wiskundige benadering via de vraag: "Wat is de volledige verzameling van tekens die de ruimte opspannen welke het A-zijn definieert?" leidt ook niet tot een simpel antwoord.*

Traditioneel waren de chemici alleenheersers in de wereld van de moleculen. Zij zijn het die de begripsvorming omtrent moleculen hebben opgebouwd, hun reacties en omzettingen hebben bestudeerd en geheel nieuwe en onbekende stoffen en materialen hebben gesynthetiseerd. De kennis, die zij de laatste 200 jaar hebben verworven en toegepast, heeft ingrijpende veranderingen in onze samenleving teweeggebracht. Om een paar voorbeelden te noemen: niet alleen de kleding die wij dragen wordt in belangrijke mate bepaald door hetgeen chemici hebben voortgebracht, ook de menselijke voortplanting is diepgaand door hen beïnvloed. Denkt u maar aan de ontwikkeling van de anticonceptiepil. In de laatste 50 jaar is de dominante positie van de chemici aangetast. Met de groeiende bewustwording dat de levensprocessen ten diepste worden geregeerd door het gedrag van moleculen hebben de moleculair biologen een belangrijk gedeelte van de wereld van de moleculen voor zich opgeëist. De activiteiten van

deze onderzoekers hebben tot fascinerende nieuwe inzichten geleid. Ze hebben bijvoorbeeld laten zien dat de erfelijke (genetische) code in wezen een moleculaire code is. Meer recentelijk, d.w.z. 2 jaar geleden, is het zelfs gelukt om, via een onderzoeksprogramma dat in omvang vergelijkbaar is met het ruimtevaartprogramma, opgezet om een man op de maan te zetten, de volledige moleculair genetische kaart van de mens in beeld te brengen.

De meesten van u hebben wel eens gehoord dat moleculen zijn opgebouwd uit atomen en dit is inderdaad een goed uitgangspunt voor een verdere beschouwing. Gezien in het kader van de evolutionaire en culturele ontwikkeling van de mens is dit een kennis, waarover we nog maar sinds kort beschikken. Pas in 1808 publiceerde de Engelsman John Dalton zijn boek "*A New System of Chemical Philosophy*", waarin hij zijn atoomtheorie uiteenzette. In modern chemisch taalgebruik kunnen zijn conclusies als volgt worden samengevat :

- Elk element bestaat uit minuscule kleine deeltjes, de atomen.
- De atomen van een gegeven element zijn identiek; de atomen van de verschillende elementen zijn fundamenteel verschillend.
- Chemische verbindingen worden gevormd wanneer atomen zich met elkaar verbinden. Een gegeven verbinding bezit altijd hetzelfde (relatieve) aantal en typen atomen.
- Tijdens chemische reacties worden de atomen anders georganiseerd, d.w.z dat de manier waarop ze met elkaar zijn verbonden wordt veranderd. De atomen zelf veranderen niet.

De conclusies van Dalton waren voor het grootste gedeelte gebaseerd op experimenteel werk van anderen, met name op het werk van de Franse chemicus Joseph Proust. In zijn experimentele wetenschapsbeoefening werd Dalton gehinderd door een paar problemen. Hij beschikte over onvoldoende financiële middelen om er een goed geëquipeerd laboratorium op na te houden, een klacht die men tegenwoordig ook nog wel eens hoort. Bovendien was hij kleurenblind, in zijn tijd een enorm probleem voor een experimenteel chemicus. Experimenteel kon hij zich dus niet meten met collega's als de zojuist genoemde Proust, als Gay Lussac, Berzelius en anderen. Door sommige wetenschapshistorici wordt hij dan ook gekarakteriseerd "As a man of philosophical insight rather than an accurate experimenter" (1). Niettemin had zijn werk grote invloed; zijn theorie was gebaseerd op welomschreven opvattingen over de samenstelling van materie. Het stelde de toenmalige chemici (of beter natuurfilosofen) in staat chemische verschijnselen te interpreteren en te coördineren op een manier die tot dan toe niet mogelijk was geweest. Bovendien maakte zijn benadering het mogelijk een kwantitatieve factor in de atoomtheorie in te voeren, namelijk de bepaling van de relatieve massa's van de atomen, de z.g atoomgewichten. Hierin verschilt zijn theorie essentieel van die van de Epicuristen, zoals Epikouros en Lucretius (2), uit de klassieke oudheid. Deze filosofen hebben opmerkelijke dingen gezegd over de karakteristieken van de deeltjes die zij atomen noemden, maar experimentele toetsing van hun theorie was niet mogelijk. Erkenning voor zijn werk kreeg Dalton in eerste instantie van Franse chemici. Pas later gebeurde dit in Engeland. Dit hield ook in dat hij op een zeker moment aan de koning diende te worden voorgesteld, maar dit stuitte op ernstige problemen. Dalton was namelijk een actief lid

van de “Society of Friends” met andere woorden hij was een Quaker. Bij de voorbereiding van dit college heb ik aan verschillende mensen gevraagd of ze wisten wat een Quaker was en de reactie was dan meestal: “Heeft dat niet iets maken met cornflakes of cruesli”? Wel inderdaad (Figuur 2) maar hier is het goed op te merken dat het ook nog een christelijke stroming is, waarin op het dragen van wapens een taboe ligt.



Figuur 2. *Cornflakes en cruesli.*

Een bezoek aan de koning vereiste dat Dalton voor die gelegenheid de officiële hofkleding, inclusief een zwaard, zou moeten dragen, hetgeen voor een vrome Quaker natuurlijk een onoverkomelijk bezwaar was. Creatieve vrienden vonden een uitweg uit dit dilemma. Niet lang daarvoor had de Universiteit van Oxford Dalton namelijk een eredoctoraat toegekend en op grond daarvan kon hij aan de koning worden voorgesteld, gekleed in een scharlakenrode toga van een doctor in de rechten. Op de vraag of hij hiertegen geen bezwaar had luidde het antwoord dat zo'n natuurlijke kleur als die van Gods groene bladeren geen bezwaar kon zijn. U ziet dus dat ook voor mensen met een handicap als kleurenblindheid geldt: “Beauty is in the eye of the beholder”.

Keren we terug naar Dalton's atoomtheorie, dan zien we dat de acceptatie ervan uiteindelijk op grote moeilijkheden stuitte. De interpretatie van de theorie leidde tot verwarring over de bepaling van de relatieve atoomgewichten en daardoor tot verschillen van mening over de atomaire samenstelling van verbindingen (moleculen). Dit wordt heel duidelijk gedemonstreerd in een tekstboek van Kékulé (3), dat verscheen in 1861. Daarin wordt het azijnzuurmolecuul notabene nog met 18 verschillende structuur formules weergegeven. De verwarring was in feite zo groot dat in 1860 door Kékulé in Karlsruhe het eerste internationale chemische congres werd georganiseerd met als doel uit deze impasse te geraken. Dit congres werd bijgewoond door meer dan honderd van de toenmaals toonaangevende chemici. Na drie dagen werd het congres echter afgebroken, omdat over de kwestie geen overeenstemming kon worden bereikt en men vond dat wetenschappelijke waarheden niet middels een meerderheid van stemmen konden worden vastgesteld.

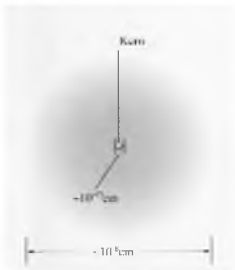
Spoedig daarna bleek echter dat de situatie wat minder somber was dan op dat moment werd gedacht. Het congres werd bijgewoond door een Italiaanse chemicus, Cannizzaro, die aan het eind daarvan een manuscript uitdeelde getiteld: "Sunto di un Corso di Filosofia Chimica". Dit manuscript bevatte het antwoord op het probleem: door de combinatie van de atoomtheorie van Dalton en de molecuul-theorie van Avogadro kon aan de verwarring een eind worden gemaakt. De theorie van de laatste was al in 1811 gepubliceerd, maar was, behalve binnen de Italiaanse school van chemici, onopgemerkt gebleven. Op dit moment zou een verdere detaillering van Avogadro's theorie te voeren, maar ik denk dat gezegd kan worden dat de moleculaire theorie van Avogadro de atoomtheorie van Dalton gered heeft. Na een

paar jaar was deze benadering door de hele chemische wereld geaccepteerd en kon al zeer snel het periodiek systeem der elementen worden opgesteld door Mendeléeff en Lothar Meyer. In dit systeem zijn de elementen (of atomen) gerangschikt overeenkomstig hun massa en hun chemische en fysische eigenschappen. Deze benadering was zo krachtig dat Mendeléeff zelfs het bestaan en de eigenschappen van elementen, die tot dan toe nog niet ontdekt waren, kon voorspellen. Een voorbeeld is het element Germanium dat in 1886 door de Duitse chemicus Winkler werd ontdekt en waarvoor Mendeléeff al in 1871 de eigenschappen had voorspeld.

Tabel 1. *Vergelijking van de eigenschappen van het element Germanium zoals voorspeld in 1871 door Mendeléeff en die welke werden waargenomen na de ontdekking van het element in 1886.*

Eigenschappen van Germanium	Voorspeld in 1871	Waargenomen in 1886
Atoomgewicht	72	72.3
Dichtheid	5.5 g/cm ³	5.47 g/cm ³
Specifieke warmte	0.31 J°C ⁻¹ g ⁻¹	0.32 J°C ⁻¹ g ⁻¹
Smeltpunt	Zeer hoog	960 °C
Verbinding met zuurstof	RO ₂	GeO ₂
Dichtheid van het oxyde	4.7 g/cm ³	4.703 g/cm ³
Verbinding met chloor	RCl ₄	GeCl ₄

Door de ontwikkeling van het periodiek systeem en de inzichten die hierdoor werden verkregen waren de grondslagen van de chemie sterk verankerd in het atoommodel van Dalton en het molecuulmodel van Avogadro, Cannizzaro en anderen. Binnen deze modellen waren de atomen vaste, harde, niet-penetreerbare deeltjes. Men wist dat de chemische en fysische eigenschappen van de atomen samenhangen met hun massa (hun gewicht), maar de reden ervoor was onbekend. Er waren daarom een groot aantal wetenschappers, met name fysici, die het bestaan van atomen betwijfelden. Bovendien waren er tegen het eind van de negentiende eeuw wel 92 verschillende elementen (atomen) bekend ieder met hun eigen specifieke chemie. Deze diversiteit werd als onbevredigend ervaren. In feite wilde men terug naar het idee van de bekende Griekse filosoof Aristoteles, het idee van de *materia prima*, die ene unieke substantie, waaruit alle overige materie zou zijn opgebouwd (1). Dit keer waren het de fysici die grote doorbraken in dit gebied bewerkstelligden.



Figuur 3. Het atoom bestaat uit een minuscule kleine kern met een diameter van 10^{-13} cm omringd door elektronen op een gemiddelde afstand van 10^8 cm. Vertalen we dit naar onze maatstaven, dus naar afstanden waarin we gemakkelijk kunnen denken en nemen we aan dat de kern een diameter heeft van 1 cm dan is de gemiddelde afstand van de elektronen 1 km.

De eerste natuurkundige die in dit verband meestal wordt genoemd is de Engelsman Joseph John Thompson, beter bekend als J.J. Zijn experimenten wezen erop dat atomen waren opgebouwd uit positief en

negatief elektrisch geladen deeltjes; de laatste noemde hij elektronen. Het atoommodel dat hij op basis van zijn resultaten ontwikkelde bleek echter incorrect te zijn. Dit volgde uit de experimenten van Ernst Rutherford. De interpretatie van zijn experimenten leidde tot een atoommodel, dat in zijn simpelste vorm nu nog geldig is. Het atoom bestaat uit een positieve kern met daaromheen een elektronenwolk, zoals aangegeven in Figuur 3, waarin de diameter van het atoom wordt vergeleken met de diameter van de kern. Het model vertoont drie opmerkelijke aspecten.

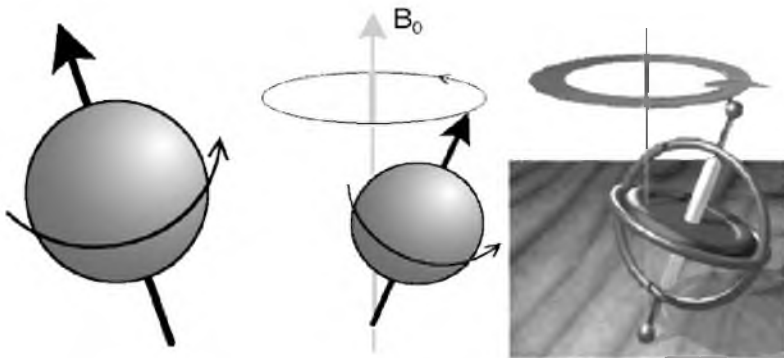
- Het eerste aspect is de geringe omvang van de kern ten opzichte van het totale atoom volume, hetgeen tot uitdrukking komt in de gegeven diameters 10^{-13} cm voor de kern en 10^{-8} cm voor de cirkel die de gemiddelde afstand van de elektronen aangeeft.
- Het tweede aspect is dat de kern een extreem hoge dichtheid (of soortelijk gewicht) heeft en dat bijna het totale gewicht van het atoom in de kern is ondergebracht. De gigantisch hoge dichtheid van kernmateriaal wordt duidelijk als we een klompje ervan ter grootte van een erwt zouden kunnen fabriceren. Zo'n erwt weegt 250 miljoen ton!
- Het derde aspect is dat alle atomen zijn opgebouwd uit dezelfde materie, d.w.z. dezelfde componenten, hetgeen de vraag oproept wat dan de oorzaak is van hun verschillende chemische eigenschappen. Deze vraag zullen we hier niet verder bespreken. In de afgelopen eeuw hebben inspanningen van chemici en fysici geleid tot een diepgaand inzicht in deze problematiek.

Hier zullen we ons nu verder concentreren op een bepaalde eigenschap van de atoomkernen die een centrale rol speelt in deze afscheidsrede, namelijk de spin van de kern.

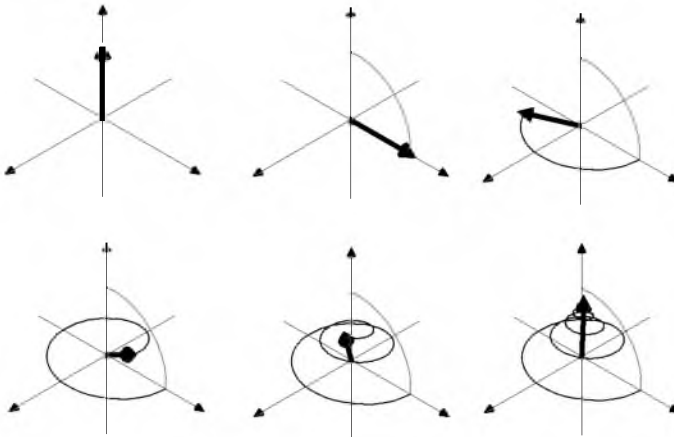
Kernspins en kernspinresonantie

Wat is nu eigenlijk de kernspin uit de titel van deze rede? De meeste atoomkernen draaien om hun as juist zoals een tol en de aarde om hun as draaien. En men kan aan nog meer voorbeelden denken, bijvoorbeeld een biljartbal of een baseball die je effect geeft.

Deze ronddraaiende beweging heet in het Engels een spin en dat woord hebben wij overgenomen. Zo draaien de meeste atoomkernen voortdurend rond en omdat ze elektrisch geladen zijn krijgen zij door deze beweging een magnetisch moment of eenvoudiger gezegd ze gedragen zich als een magneetje. Bijvoorbeeld, als je ze in een magneetveld zet, richten ze zich langs dat veld. Denkt U maar aan een kompasnaald, die zich richt in het magneetveld van de aarde. De atomaire magneetjes of zoals we ze in het vervolg gemakshalve zullen noemen, de kernspins, doen dat ook. Bovendien voeren ze ook een z.g. precessiebeweging uit, juist zoals een tol die je een beetje scheef zet. Een tol draait dan niet alleen om zijn eigen as maar ook om een as loodrecht op het aardoppervlak (richting van het zwaartekrachtveld). Zo draait een atomaire magneetje in een magneetveld (zie Figuur 4).

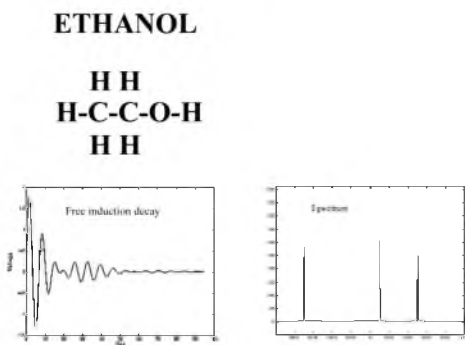


Figuur 4. Links: rotatie van een kern om zijn as. Midden: precessie beweging van een kern in een magneetveld, B_0 . Rechts: precessiebeweging van een tol in het veld van de zwaartekracht.



Figuur 5. Beweging van een kernspin in een magneetveld na een 90° puls. Linksboven: de kernspin (dikke pijl) is gericht langs het magneetveld (dunne verticale pijl). Midden boven: oriëntatie van de kernspin onmiddellijk na de 90° puls. Rechtsboven: vervolgens roteert de kernspin om het magneetveld en keert zoals weergegeven in de drie onderste plaatjes terug naar zijn evenwichtstoestand.

Fysici hebben methoden ontwikkeld om die precessiebeweging van de kernspins zichtbaar te maken (4,5). De te bestuderen stof wordt onderworpen aan pulsen van radiogolven, hetgeen wordt geïllustreerd in Figuur 5. Met behulp van een radiogolf puls draaien we de kernspins 90° . Daarna laten we ze aan zichzelf over; ze draaien dan om de richting van het magneetveld en relaxeren intussen terug naar de evenwichtstoestand. Dit heeft als resultaat dat de kernspins een elektrische spanning opwekken in de ontvangspoel van het instrument en het resulterende signaal kunnen we meten. Dit wordt geïllustreerd in Figuur 6 voor de stof ethanol, beter bekend als alcohol. De chemische structuurformule van het ethanol molecuul is aangegeven. Het bestaat uit zes waterstofatomen (H), twee koolstof atomen (C) en één zuurstof atoom (O). In het experiment kijken we naar het signaal afkomstig van de waterstof atomen. Het tijdsafhankelijke gedrag van de elektrische spanning is links in Figuur 6 weergegeven. Na Fourier transformatie (een wiskundige bewerking) van dit signaal ontstaat het spectrum (rechts in Figuur 6), dat bestaat uit drie signalen afkomstig van de drie verschillende typen waterstofatomen in het ethanol molecuul. Dit proces staat bekend als



Figuur 6. Links: signaal afkomstig van de elektrische spanning opgewekt in de ontvangspoel van de NMR spectrometer door de kernspins van de waterstof atomen in het ethanol molecuul. Rechts: het spectrum van ethanol verkregen na Fourier transformatie van het signaal in het linker plaatje.

kernmagnetische resonantie spectroscopie of Nuclear Magnetic Resonance spectroscopie (NMR spectroscopie).

Het ethanol spectrum gegeven in Figuur 6 was echter niet wat de fysici zagen toen ze voor het eerst dit experiment deden; toen vonden ze maar één waterstofsignaal. De drie signalen werden pas waargenomen na de verbetering van de apparatuur, d.w.z. nadat er magneten met meer homogene magneetvelden ter beschikking kwamen. De ontdekking van de drie signalen van het ethanol sloeg in als een bom want het was meteen duidelijk dat de methode een prachtig en snel hulpmiddel zou zijn voor de analyse van chemische stoffen; het gebruik van allerlei destructieve chemische methoden voor de analyse van verbindingen werd daardoor overbodig. Het duurde dan ook niet lang voordat elk organisch chemisch laboratorium van enige standing een wat we nu een NMR spectrometer noemen in huis hadden.

Mijn eerste kennismaking met de kernmagnetische resonantie vond plaats toen ik binnen de afdeling Fundamentele Physica in het Shell Laboratorium, waarin ik door Dr. Joan van der Waals was opgenomen na mijn opleiding tot laboratoriumassistent, werd overgeplaatst van de groep vloeistoffysica naar de groep magnetische resonantie om te assisteren bij het NMR onderzoek van Dr. Cor Maclean en Dr. Eddy Mackor. Zij waren de eersten in Nederland die NMR toepasten op chemische problemen. Bij mijn start in de NMR-groep werd ik ingezet bij een project, waarin het relaxatiegedrag van z.g. twee-spin systemen, in dit geval fluor en waterstof, werd bestudeerd. In fraaie experimenten werd een aantal nieuwe aspecten van de kernspinrelaxatie aan het licht gebracht. Zoals gezegd keren kernspins terug naar de

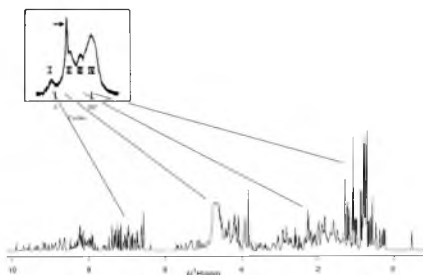
evenwichtstoestand als ze door een of andere ingreep uit evenwicht zijn gebracht. Deze relaxatie kan door verschillende mechanismen tot stand worden gebracht. Wanneer de relaxatieprocessen aan elkaar gecorreleerd zijn treden speciale effecten op. Maclean en Mackor toonden voor het eerst aan dat een dergelijke correlatie optreedt als de relaxatieprocessen tengevolge van de dipool-dipool koppeling en van de anisotropie in de chemische verschuiving gecorreleerd zijn (6). Dergelijke effecten kunnen ook optreden tussen twee dipool relaxatietermen in systemen met meer dan twee spins. Dit effect werd voor het eerst een aantal jaren later, hier aan de KUN, ondubbelzinnig aangetoond door De Miranda gedurende ons onderzoek aan acetrisoaat, een niercontrastmiddel (7).

In het midden van de jaren zestig aanvaardde Maclean een benoeming tot hoogleraar fysische chemie aan de Vrije Universiteit en bood mij een functie van labassistent aan in zijn nieuwe research groep. Na enig wikken en wegen besloot ik hem te volgen. Ik had inmiddels het staatsexamen HBS B en de MO akte natuur- en scheikunde behaald en deze overgang bood mij de gelegenheid om naast het laboratoriumwerk mijn academische studies af te ronden. Het onderzoek aan de VU richtte zich vooral op vloeibare systemen die in het magneetveld van de spectrometer konden worden uitgericht. Enerzijds waren dit vloeibare kristallen, anderzijds werd getracht door het aanleggen van sterke elektrische velden uitrichting in polaire vloeistoffen te bewerkstelligen.

In het internationale onderzoeksveld tekenden zich inmiddels zeer belangrijke ontwikkelingen af. De spectaculaire resultaten van het

moleculair biologisch onderzoek vormden voor veel NMR-spectroscopisten een stimulans om hun activiteiten te verleggen en de NMR methode dienstbaar te maken aan de moleculaire levenswetenschappen. De uitdagingen die de moleculaire biologie bood hebben een diepgaande invloed gehad op de ontwikkeling van de NMR spectroscopie. Het leidde tot fundamentele en ingrijpende veranderingen waardoor deze methode zich kon ontwikkelen tot de meest krachtige techniek waarmee de structuur en dynamica van (bio)moleculen in oplossing bestudeerd konden worden.

Halverwege de jaren '60 was dit echter nog toekomstmuziek. Met de toenmalige technologie, met name de beperkte stabiliteit en sterkte van de beschikbare elektromagneten, was het niet mogelijk NMR spectra te genereren van biomoleculen (eiwitten en nucleïnezuren) die ongeveer duizend waterstofatomen bevatten, zodanig dat dan de afzonderlijke signalen van deze atomen konden worden waargenomen. Hierin kwam verandering toen rondom 1970 de eerste NMR spectrometers op de markt kwamen, welke waren uitgerust met supergeleidende magneten met magneetvelden corresponderend met proton resonantiefrequenties van 200 tot 300 MHz.



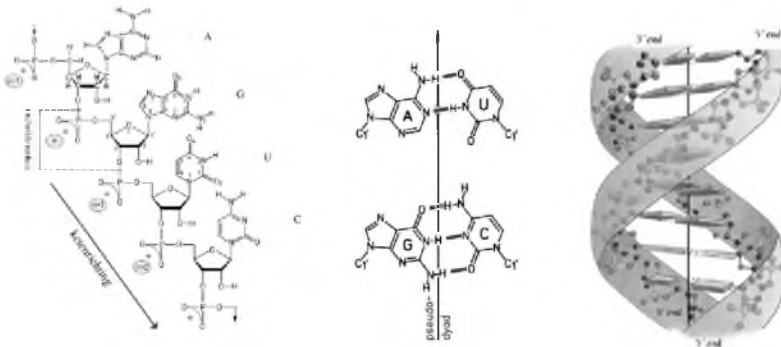
Figuur 7. Boven: eerste NMR spectrum van een eiwit, het ribonuclease, opgenomen bij 40 MHz. Onder: eiwit spectrum van het eiwit lysozyme opgenomen met een moderne 600 MHz NMR spectrometer. De pijlen verbinden de overeenkomstige spectrale gebieden van de eiwitten.

Door de introductie van deze instrumenten werd een belangrijke verbetering in spectrometer stabiliteit, gevoeligheid en spectrale resolutie bereikt. Weliswaar konden de spectra van bijvoorbeeld eiwitten en nucleïnezuren nog niet volledig worden opgelost maar vaak konden kernen met resonantieposities separaat van de bulk van het spectrum duidelijk worden onderscheiden (zie Figuur 7).

Deze ontwikkelingen bleven in Nederland niet onopgemerkt. Ze triggerden verschillende initiatieven om dit type onderzoek ook binnen ons land mogelijk te maken. In Nijmegen werd een lectoraat in de biofysische chemie ingesteld om NMR onderzoek aan biomacromoleculen te starten. Omstreeks deze tijd had ik juist mijn promotie voltooid en ik had het voorrecht op deze plaats benoemd te worden. De benoemingscommissie onder voorzitterschap van Prof. Bert de Boer vond het echter noodzakelijk dat ik eerst ervaring op zou doen in dit specifieke veld en niet lang na mijn benoeming vertrok ik met mijn gezin naar de Verenigde Staten om in de groep van Dr. Robert Shulman (Bell Laboratories) ervaring op te doen met NMR aan biomacromoleculen. Bell Labs was in die tijd (1972) één van de weinige instituten ter wereld waar 220 en 300 MHz NMR apparatuur beschikbaar was, een van de redenen om voor dit laboratorium te kiezen.

Juist voordat ik er arriveerde waren de resonanties ontdekt van de iminoprotonen die in de Watson-Crick base paren van nucleïnezuur structuren in waterstofbruggen zijn opgenomen. Om u duidelijk te maken wat ik hiermee bedoel moet ik eerst een paar opmerkingen maken over enige essentiële aspecten van nucleïnezuurstructuren. Nucleïnezuren zijn lange ketens (het bekende DNA en zijn zusje RNA), die zijn opgebouwd uit nucleotiden. Er zijn vier verschillende

nucleotiden; ze worden gekarakteriseerd door vier verschillende basen: adenine (A), guanine (G), cytosine (C) en uridine (U) (zie Figuur 8).



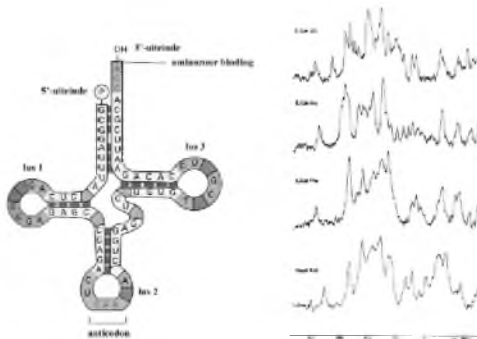
Figuur 8. Links: fragment van een ribonucleïnezuurketen. De vier verschillende basen zijn geannoteerd: adenine (A), guanine (G), cytosine (C) en uridine (U). De richting van de suiker-fosfaatketen is gedefinieerd van het 5'- naar het 3'-uiteinde. Tevens is de definitie van een nucleotide gegeven. Midden: de complementaire basen A en U alsook G en C vormen z.g Watson-Crick basenparen. Rechts: ketens met complementaire basen kunnen de beroemde dubbele helix vormen. De plankjes geven de gevormde basenparen weer. De banden representeren de suiker-fosfaatketens.

Via de vorming van waterstofbruggen kunnen de complementaire basenparen vormen zoals aangeduid in Figuur 8. Het waterstof atoom dat de beide stikstofatomen (N) in de beide ringen verbindt is het imino-waterstof atoom. Wanneer twee nucleïnezuurketens complementair zijn d.w.z indien de basenvolgorde voor de beide ketens zodanig is dat elke base in de sequentie van de ene streng juist een

complementaire base in de sequentie van de andere streng tegenover zich vindt kan een dubbele helix gevormd worden. Aangezien er maar één iminoproton per basenpaar is kunnen we door het aantal resonanties in het NMR spectrum te tellen het aantal basenparen in een dubbele helix bepalen.

Bij mijn komst in Bell Labs startten we met het bestuderen van de iminoprotonresonanties van transfer RNA's (tRNAs). Deze moleculen spelen een sleutelrol in de eiwitsynthese. In de levende cel zijn er meer dan twintig verschillende tRNA-moleculen aanwezig. Het was mogelijk gebleken de basenvolgorde in tRNA-moleculen vast te stellen. Het bleek dat de tRNA keten zodanig gevouwen kon worden dat, ondanks de verschillende basenvolgorde van de verschillende tRNA's, altijd een verdeling van complementaire basen aanwezig zou zijn. Er kunnen dan vier dubbele helices gevormd worden, zodat een klaverblad structuur ontstaat (zie Figuur 9). Dit vormde een sterke aanwijzing voor het bestaan van deze helices en inderdaad konden we iminoproton spectra voor deze moleculen meten. Een voorbeeld is te zien in Figuur 9 waar voor verschillende tRNA's deze spectra worden getoond. De resonanties zijn van het hierboven genoemde type: ze liggen geheel vrij van de overige resonanties in een nucleïnezuurspectrum. Zoals we mochten verwachten zijn de iminoproton spectra van de onderscheiden tRNA's inderdaad verschillend. Een volgende uitdaging was het toekennen van de resonanties aan bepaalde basenparen in het molecuul. Dit werd gedaan met z.g. ring current berekeningen en hoewel dit zeker niet een helemaal waterdichte methode was, bleek ze in combinatie met fragmentstudies voldoende betrouwbaar om de spectra te kunnen analy-

seren en zo werd een verdere bevestiging van het bestaan van het tweedimensionale klaverbladmodel van het tRNA verkregen (8). Bovendien stelde dit ons in staat diepgaand het ontvouwendegedrag van tRNA moleculen te bestuderen door de NMR experimenten te combineren met z.g T-jump experimenten.



Figuur 9.

Links: het tRNA klaverblad model. Het molecuul bevat vier dubbele helix gedeelten waarin de Watson-Crick basenparen A-U en G-C duidelijk zijn aangegeven. Rechts: de iminoproton spectra van vier verschillende tRNA's.

Er was al bekend dat dubbele helices door temperatuursverhoging gedissocieerd kunnen worden in de enkelstrengs ketens. Dit proces staat bekend als het smelten van de helices. Met behulp van de genoemde combinatie van experimenten waren we in staat de stabiliteit van de verschillende onderdelen van het tRNA molecuul te meten en bovendien de dissociatie- en associatiesnelheden van die onderdelen te bepalen (9). De resultaten uit deze metingen kunnen als volgt worden samengevat:

- De interactie tussen lus 1 en lus 3 (c.f. Figuur 9) is de zwakste schakel in de drie-dimensionale tRNA structuur. De laatste was inmiddels via Röntgendiffractie metingen opgehelderd.

- De stabiliteit en kinetiek van de overige (haarspeld) structuren bleken in eerste benadering voorspelbaar op basis van gegevens beschikbaar voor modelsystemen.
- In separate experimenten in samenwerking met Dr. Dinshaw Patel bleek dat fraying reacties (rafelen) kunnen optreden aan de uiteinden van dubbele helices (10).

Na mijn terugkeer in Nederland vervolgde ik het onderzoek aan tRNA. Tevens startte ik onderzoek aan eiwitten. In samenwerking met andere leden van de afdeling biofysische chemie betrof dit onderzoek aan hemoglobine en wat later aan ribosomale eiwitten en in samenwerking met de afdeling Moleculaire Biologie onderzoek aan het gen-5 eiwit van het bacteriofaag M13. Vooral de interacties met Dr. Ruud Konings waren intensief en succesvol, hetgeen resulteerde in zijn benoeming tot bijzonder hoogleraar biofysische chemie. Op dit moment vermeld ik ook de vruchtbare samenwerking met de groep van Prof. Leen Bosch en Prof. Jacques van Boom van de Universiteit Leiden, die in deze periode een aanvang nam en die tot de dag van vandaag werd voortgezet. Het genoemde onderzoek werd mogelijk omdat ik enerzijds van de KUN bij mijn benoeming een 100 MHz NMR spectrometer ter beschikking kreeg, waarmee zinvolle fosformetingen konden worden gestart, anderzijds omdat er bij mijn terugkomst in Nederland inmiddels door Prof. Herman Berendsen (RUG), in samenwerking met het toenmalige SON, initiatieven ontplooid waren om via NWO-subsidies de aanschaf van een hoge resolutie NMR spectrometer mogelijk te maken, die ten dienste zou staan van Nederlandse groepen die zich bezig hielden met NMR aan biomacromoleculen. Deze acties waren succesvol en de eerste Nationale Hoogfrequent SON NMR Faciliteit in Groningen ging van

start. Als wetenschappelijk supervisor van deze faciliteit werd Dr. Rob Kaptein aangesteld. Om het biomoleculaire NMR onderzoek in Groningen verder te versterken werd Dr. George Robillard, ook afkomstig uit de groep van Shulman, als lector in de biomoleculaire NMR benoemd. De aangeschafte 360 MHz spectrometer was uniek voor Nederland en bovendien, internationaal gezien, één van de eerste van deze generatie van spectrometers die werd geïnstalleerd. De groepen die vervolgens intensief gebruik maakten van het apparaat waren C. Altona (Leiden), C.W. Hilbers (Nijmegen), R. Kaptein (Groningen), B. de Kruijff (Utrecht), G.T. Robillard (Groningen), C. Veeger/F. Müller (Wageningen) en J. Vliegthart (Utrecht).

Het tRNA onderzoek in Nijmegen richtte zich in die tijd op de codon-anticodon herkenning en op de exploratie van fosfor NMR in de karakterisatie van de tRNA's. Tevens kon in samenwerking met Prof. Leen Bosch de secundaire structuur van het 3'-uiteinde van ribosomaal RNA (het z.g. cloacine fragment) worden afgeleid en de stabiliteit en kinetiek van zijn haarspeldstructuur worden vastgesteld. Ook werden de eerste resultaten geboekt bij de karakterisering van het gen-5 eiwit. Dit eiwit is een enkelstrengs-DNA bindend eiwit dat een centrale rol speelt in de levenscyclus van bacteriofaag M13 (*vide infra*). In die experimenten kon worden afgeleid welke eiwitresiduen betrokken zijn in de interactie met het DNA.

Deze experimenten en soortgelijke studies in andere laboratoria aan andere systemen demonstreerden duidelijk de mogelijkheden en onmogelijkheden van de toepassing van de NMR spectroscopie in het onderzoek aan biomacromoleculen in die tijd. De resultaten waren spectacu-

lair omdat werd aangetoond dat, met behulp van de beschikbare NMR apparatuur, de structuur-functie eigenschappen van grote moleculen zoals bijvoorbeeld tRNA (MW 28 kDa) en hemoglobine (MW 65 kDa) konden worden bestudeerd met een diepgang die kort daarvoor nog voor onmogelijk werd gehouden. Anderzijds brachten de experimenten ook duidelijk de tekortkomingen van de bestaande NMR technologie aan het licht. De spectra werden nog met de z.g. continuous wave (CW) methode opgenomen. Dit betekent dat bij een constant magneetveld de frequentie van het ingestraalde elektromagnetische vermogen zodanig werd gevarieerd dat alle signalen uit het spectrum werden geëxciteerd. NMR is echter een intrinsiek ongevoelige techniek vergeleken bij andere vormen van spectroscopie. Een tweede probleem waar de biomoleculaire NMR spectroscopisten mee geconfronteerd werden betrof de spectrum interpretatie. Het was heel moeilijk om bepaalde resonanties in het spectrum toe te kennen aan bepaalde kernen (in het algemeen protonen) in het bestudeerde molecuul. Dit werd nog verder bemoeilijkt omdat het grootste gedeelte van de protonresonanties in een eiwit- of nucleïnezuurspectrum een grote mate van overlap vertoonde. Om toch ten minste voor de opgeloste en redelijk opgeloste resonanties tot een toekenning te kunnen komen werden vele verschillende benaderingen toegepast, soms gebruikmakend van ingenieuze experimenten. Eén manier van aanpak werd al genoemd, namelijk de toepassing van ring current berekeningen bij de interpretatie van de iminospectra van nucleïnezuuren. Deze benadering was echter maar beperkt toepasbaar en had ook enkele belangrijke tekortkomingen.

In deze periode kwam echter de Fourier Transformatie NMR (FT-NMR) tot wasdom. Deze benadering werd direct een groot succes

omdat de bemonstering van het spectrum veel efficiënter kon worden uitgevoerd dan via de wat primitieve aanpak van de CW-methode. Men kon, voor gelijke meettijd, met de FT-methode een veel betere signaal-ruis verhouding verkrijgen dan met de CW-methode. Tevens bood FT-NMR de mogelijkheid pulsmethoden te ontwikkelen met behulp waarvan het probleem van de spectruminterpretatie op een systematische manier kon worden aangepakt. Hiervoor was echter apparatuur van een nieuwe generatie nodig met een hogere stabiliteit, een hogere spectrale resolutie en uitgerust met puls-faciliteiten. Gezien het succesvolle verloop van het Nederlandse biomoleculaire NMR onderzoek besloot SON de hoge resolutie NMR faciliteiten uit te breiden met een nieuwe vestiging in Nijmegen. Deze werd in 1981 geopend en was uitgerust met een 200 en een 500 MHz NMR apparaat. Dr. Cees Haasnoot werd benoemd als wetenschappelijk supervisor van de faciliteit en hiermee startte een vruchtbare en plezierige samenwerking voor een reeks van jaren. Het 500 MHz instrument was opnieuw één van de eerste afgeleverde spectrometers van de toenmalige jongste generatie, waarmee een nieuwe fase van het onderzoek werd ingeluid.

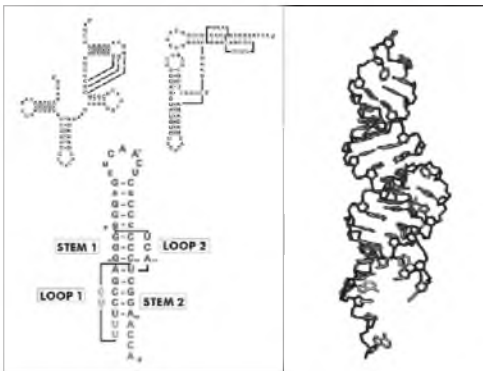
Zoals al eerder werd aangegeven was de moeilijkheid om tot een volledige interpretatie van de spectra van eiwitten en nucleïnezuren te komen een belemmering voor verdere vooruitgang. Toekenning van de resonanties in deze spectra was een *conditio sine qua non* om de driedimensionale structuur van eiwitten, nucleïnezuren en andere biomoleculen in oplossing te kunnen bepalen. Het is interessant om op te merken dat in 1981 Jardetzky en Roberts in hun voortreffelijke boek "NMR in Molecular Biology" aangaven dit ook 'in the fore-

seeable future' niet mogelijk te achten. De toekomst was toen echter al begonnen en wel dank zij de introductie van de z.g tweedimensionale NMR spectroscopie. Hierdoor raakte het biomoleculaire NMR onderzoek in een stroomversnelling en halverwege de jaren tachtig verschenen de eerste driedimensionale eiwit en nucleïnezuur structuren in de literatuur.

In ons laboratorium hield de promovendus Frank van de Ven de driedimensionale structuur op van het ribosomale eiwit EL30 uit *E. coli* (11). Tevens ontwikkelde van de Ven het z.g. product operator formalisme, een kwantummechanische theorie voor de beschrijving van pulsexperimenten voor multidimensionale NMR spectroscopie (12). Deze theorie, die tegelijkertijd in het laboratorium van Ernst (Zürich) werd ontwikkeld, vormt nu overal de grondslag voor de beschrijving en analyse van de moderne puls NMR. Ook de eerste ruimtelijke nucleïnezuurstructuren werden in deze periode opgehelderd. Daarbij viel de nadruk vooral op de structuuropheldering van een aantal DNA haarspeldmoleculen, waarvan we de thermodynamische en kinetische eigenschappen al hadden bestudeerd. Binnen het tijdsbestek van deze afscheidsrede is het natuurlijk niet mogelijk al deze resultaten in detail te bespreken en ik wil me daarom liever concentreren op enkele specifieke onderwerpen. Het eerste betreft het onderzoek aan z.g pseudo-knoop motieven. Dit zijn specifiek gevouwen RNA fragmenten die te vinden zijn in bijna al het RNA dat voorkomt in de levende cel. Het tweede onderwerp heeft betrekking op ons onderzoek aan virale gen-5 eiwitten.

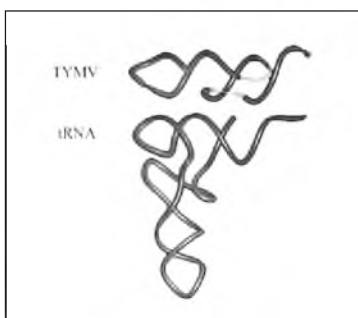
RNA pseudo-knopen

Pseudo-knoop structuren werden voor het eerst gevonden in plantenvirussen. In het begin van de jaren '70 ontdekten plantenvirologen dat het 3'-uiteinde van het RNA van sommige virussen eigenschappen bezit welke tot dan toe uitsluitend werden toegeschreven aan tRNA moleculen. Het 3'-uiteinde van het virale RNA kon bijvoorbeeld beladen worden met een aminozuur gebruikmakend van hetzelfde enzym, amino-acyl-synthetase, dat tRNA's belaaft met een aminozuur. Bepaling van de nucleotide sequentie van het 3'-uiteinde van zulke RNA's liet zien dat dit niet volledig in de bekende tRNA-klaverblad structuur kon worden opgevouwen. Zie Figuur 10, waar dit wordt gedemonstreerd voor het 3'-uiteinde van het RNA van Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV).



Figuur 10. Links: in de 2-dimensionale structuur linksboven is getracht het 3'-uiteinde van het TYMV RNA in een klaverblad structuur te vouwen. Dit lukt indien een pseudo-knoop wordt ingevoerd zoals rechtsboven voor een wat andere representatie van de secundaire tRNA structuur wordt geïllustreerd. Linksonder: het fragment dat met NMR werd bestudeerd. Rechts: de 3-dimensionale structuur van dit fragment.

Een haarspeldstructuur in het 5'-uiteinde van het RNA fragment belet de vorming van de z.g acceptor stam. Het is de verdienste van Prof. Kees Pleij uit Leiden, dat hij gezien heeft dat een pseudo-knoopstructuur gevormd kan worden door basen in de lus van deze haarspeld met complementaire basen uit de voorafgaande streng te verbinden tot een dubbele helix, en dat daardoor de acceptorstam en dus ook de gehele tRNA structuur wel kan ontstaan (zie Figuur 10). Tot zover is dit voorstel nog papierchemie. Bevestiging van het model kon gedeeltelijk worden verkregen via enzymatische en chemische modificatie studies, maar een echt inzicht vereist veel meer details. Dit werd verkregen via de NMR studies van Michael Kolk (13). Voor het tRNA fragment linksonder in Figuur 10 leidde hij een gedetailleerde structuur af, die in de rechterhelft van Figuur 10 is afgebeeld. Deze structuur vertoont allerlei interessante details waarover ik nu niet verder zal spreken. Wel wil ik haar vergelijken met die van het tRNA molecuul. Dit wordt gedaan in Figuur 11, waar alleen de meest eenvoudige structuurvoorstelling van de beide moleculen onder elkaar zijn gezet d.w.z boven het molecuul met de pseudo-knoop en onder het tRNA molecuul.



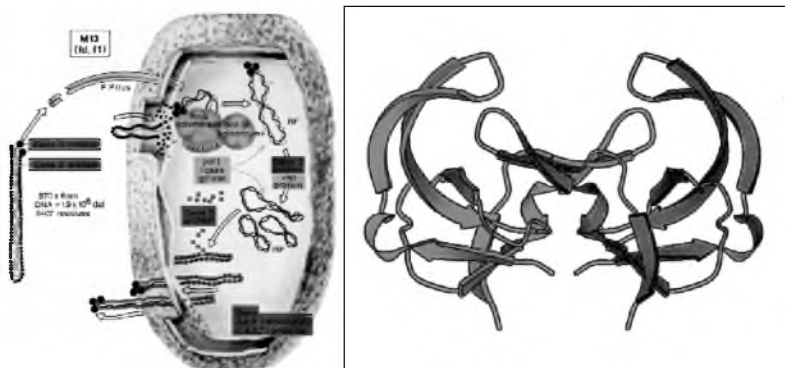
Figuur 11. *Vergelijking van de structuur van het molecuul met de pseudo-knoop met de structuur van het tRNA, met name het TΨC-acceptor gedeelte waaraan het aminozuur wordt bevestigd.*

Het is duidelijk dat het z.g. TΨC-acceptor gedeelte van het tRNA molecuul dezelfde vouwing heeft als het molecuul met de pseudo-knoop afgezien van het pseudo-knoop gedeelte waarvan de lussen (aangegeven in lichtgrijs) aan de voorkant van het molecuul, d.w.z in de richting van de kijker, zijn gesitueerd. Dit betekent dat het amino-acyl-synthetase, het enzym, dat het aminozuur aan het 3'-uiteinde van het tRNA bevestigt, aan de achterkant van het molecuul moet binden, want daar komen de structuren van beide moleculen overeen. Door Prof. Dino Moras en zijn groep (Straatsburg) was al eerder gevonden, dat er twee typen van het enzym amino-acyl tRNA synthetase bestaan. Het enzym dat specifiek bindt aan het TYMV RNA blijkt inderdaad van het type dat aan de achterkant bindt.

Enkelstrengs DNA bindende gen-5 eiwitten

Deze eiwitten spelen een sleutelrol in de levenscyclus van een aantal bacteriofagen (of fagen). Dit zijn virussen die bacteriën als gastheer gebruiken, d.w.z. dat ze zich daarin voortplanten. De levenscyclus van bacteriofaag M13, die de bekende darmbacterie *E. coli* als gastheer gebruikt, is afgebeeld in Figuur 12. De faag bestaat uit een circulair DNA molecuul, van ongeveer 6200 nucleotiden, dat is opgeborgen in een mantel van eiwitmoleculen. De faag dringt via de z.g. F-pili de bacterie binnen. In dit proces blijven de manteleiwitten achter in het binnenmembraan van de *E. coli* bacterie en het DNA komt terecht in het cytoplasma. Daar wordt het gebruikmakend van de machinerie van de bacterie omgezet in dubbelstrengs circulair DNA, dat verder dienst doet als matrijs voor de vermenigvuldiging van het faag DNA en op basis waarvan ook faag eiwitten, waaronder het gen-5 eiwit, worden geproduceerd. Wanneer het gen-5 eiwit tot een zekere concentratie is

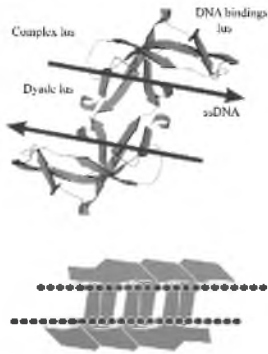
opgebouwd treedt er een verandering op in de DNA productie en wel van dubbelstrengs naar enkelstrengs circulair DNA. Dit laatste wordt geheel bedekt door het gen-5 eiwit en vormt het deeltje waaruit de nieuwe fagen, de nakomelingen, worden geproduceerd.



Figuur 12. De levenscyclus van bacteriofaag M13 in de *E. coli* cel (links) en de ruimtelijke structuur van het gen-5 eiwit (rechts).

In dit proces, waarbij het deeltje zich door de bacteriewand naar buiten beweegt wordt het gen-5 eiwit vervangen door het mantel-eiwit. In de loop der jaren hebben we heel veel onderzoek aan dit eiwit gedaan. Zo is bijvoorbeeld het bindingsgedrag van het eiwit en het DNA uitvoerig onderzocht en gekwantificeerd. We ontdekten dat het eiwit op twee manieren aan DNA kan binden. Bovendien bleek de binding sterk coöperatief te zijn, d.w.z dat als eenmaal één eiwit aan het DNA is gebonden de volgende veel gemakkelijker binden (14). Ook werd bestudeerd welke eiwit residuen in het eiwit-DNA complex aan het DNA binden. Ten slotte werd de structuur van twee verschillende gen-5 eiwitten opgehelderd. Het in de cel actieve eiwit blijkt een

dimeer te zijn d.w.z. een complex van twee gen-5 eiwit moleculen (15,16) (Figuur 12).

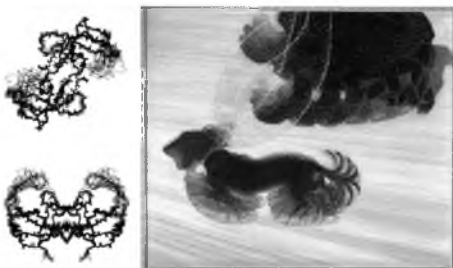


Figuur 13. Aspecten van het gen-5 eiwit-DNA complex. Boven: het gen-5 eiwit dimeer, 90° gedraaid ten opzichte van de situatie in Figuur 12. Stukken van het circulaire faag DNA zijn ingetekend als pijlen gesitueerd in de bindingsgroeven van het eiwit. Onder: schema van een fragment van het gevormde cellulair filamentaire eiwit-DNA complex. De kralen kettingen stellen de DNA ketens voor die bij elkaar worden gehouden door drie achter elkaar gebonden eiwit dimeren.

Dit dimeer is symmetrisch, het heeft zoals we zeggen een tweetallige as van symmetrie, hetgeen een functionele betekenis heeft. Dit is te zien in Figuur 13, waar een model getekend is voor een klein gedeelte van het eiwit DNA complex. Om zo'n langgerekt deeltje te kunnen maken moeten twee kanten van het circulaire DNA naar elkaar worden togetrokken. De tegenover elkaar liggende DNA strengen liggen dan antiparallel. Toch kan dan vanwege de symmetrie van het eiwit dimeer het DNA op dezelfde manier worden gebonden. Een ruimtelijk model van het eiwit DNA complex kon vervolgens verkregen worden door onze NMR resultaten te combineren met die uit elektronenmicroscopie en met moleculaire dynamica berekeningen. Middels de analyse van deze structuur konden een aantal interessante problemen worden opgelost, maar daarvoor moet ik U iets meer vertellen over de structuuropheldering van het gen-5 eiwit. De eerste structuurbepaling van dit eiwit vond plaats met behulp van röntgen-diffractie metingen.

Deze structuur bleek echter incorrect en daarom bepaalden de onderzoekers een tweede structuur. In dat stadium hadden wij met behulp van NMR zoveel informatie over de secundaire vouwing van het eiwit verkregen dat we tot de conclusie moesten komen dat ook de tweede röntgenstructuur incorrect moest zijn. We vervolgden daarom onze pogingen om met behulp van NMR de driedimensionale structuur af te leiden en het resultaat heeft U zojuist gezien. Inmiddels begon een team, waarvan Prof. Andrew Wang, waarmee wij al langer samenwerkten, deel uitmaakte, aan een nieuwe poging om m.b.v. Röntgendiffractie de ruimtelijke structuur van het eiwit op te helderen. Omdat zij moeilijkheden hadden om in hun diffractiepatronen de peptideketen te traceren gebruikten ze onze secundaire structuur als uitgangspunt en zo waren ze in staat een zelfconsistente ruimtelijke structuur te produceren, die een maand na onze publicatie in de literatuur verscheen. Hoewel beide structuren grote overeenkomsten vertoonden waren er kleine verschillen wat de vraag deed rijzen of er toch nog weer fouten zaten, hetzij in de kristalstructuur of in de NMR structuur. Dit bleek niet het geval te zijn. De verschillen volgen uit een aspect van de NMR structuurbepaling dat ik nog niet heb besproken. De afstanden tussen de atomen zoals die bepaald worden met behulp van NMR zijn niet oneindig nauwkeurig. In de praktijk betekent dit dat meerdere structuren kunnen voldoen aan de data die uit de NMR experimenten worden afgeleid. Dit wordt geïllustreerd in Figuur 14. Hier zijn 12 verschillende structuren, die allemaal voldoen aan de NMR resultaten, zo goed mogelijk over elkaar gelegd. Het is duidelijk dat voor de kern van het molecuul de interatomaire afstanden de structuur goed bepalen. Dit is niet het geval voor de DNA bindingsarm en enkele andere lussen. Via relaxatie-

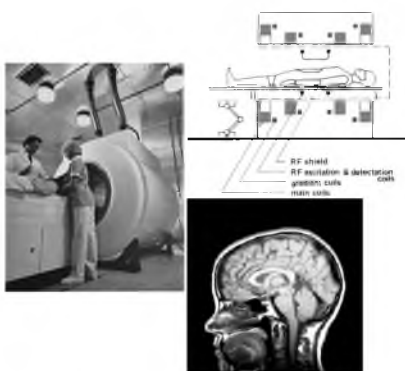
metingen hebben we kunnen aantonen dat dit het gevolg is van interne bewegingen in het eiwit (17). Je zou kunnen zeggen dat juist zoals een fototoestel een bewegend voorwerp vaak niet scherp kan afbeelden, NMR de structuur van een molecuul met interne bewegingen niet scherp kan afbeelden. Hiermee hebben we ook in het dagelijks leven te maken zoals het schilderij van Giacomo Balla duidelijk laat zien (Figuur 14). Wil je ergens komen, ongeacht of je een eiwit dan wel een poedeltje bent, dan moet je flexibel zijn.



Figuur 14. Links: overlap van twaalf verschillende gen-5 eiwit structuren, in twee verschillende oriëntaties, waarin de interne flexibiliteit van het eiwit tot uitdrukking komt. Rechts: "Dynamism of a dog on a leash", een schilderij van Giacomo Balla (1912).

Dames en heren, met deze voorbeelden heb ik getracht U te laten zien hoe spectaculair de ontwikkeling van de NMR spectroscopie is geweest. Een belangrijke basis hiervoor zijn technische ontwikkelingen zoals de bouw van supergeleidende magneten met zeer hoge en homogene velden en de introductie van steeds geavanceerder elektronica en computers. Door de jaren is de sterkte en omvang van de supergeleidende magneten en daarmee de meetfrequentie toegenomen. Stak de NMR spectroscopist bij een 300 MHz instrument nog boven de magneet uit, bij 600 MHz moet hij al een trap op om zijn monster te kunnen inbrengen en bij het modernste 900 MHz instrument moet hij, inmiddels grijs geworden, een trap van drie maal zijn

eigen lengte beklimmen. De kosten zijn inmiddels ook aanzienlijk toegenomen. Waar eind jaren '60 spectrometers nog ongeveer f 250.000 kostten, moet voor de nieuwste generatie 900 MHz instrumenten rond 5 miljoen euro worden neergeteld. Zeer aanzienlijke bedragen maar met een geweldige opbrengst. Mocht u niettemin in dit stadium uw interesse in NMR hebben verloren dan kan ik u verzekeren dat NMR zijn interesse in u niet verliest (zie Figuur 15).



Figuur 15. *NMR als diagnostisch apparaat: de MRI methode in het ziekenhuis. Links wordt de patiënt gereedgemaakt om in de magneet te worden geplaatst. Rechtsboven een schema van een patiënt in de magneet voor opnamen van de buik. Rechts onder een sagittale doorsnede van het hoofd van een patiënt.*

Toekomstige ontwikkelingen

Vandaag had ik de eer de eerste steen te mogen leggen voor het nieuwe NMR gebouw, dat deel zal gaan uitmaken van de totale nieuwbouw van de Faculteit Natuurwetenschappen, Wiskunde en Informatica. Het is een blijk van vertrouwen dat de Faculteit stelt in het NMR onderzoek en de beloften die het inhoudt. Deze beloften worden gedragen door de twee nieuwe hoogleraren Professor Arno Kentgens en Professor Sybren Wijmenga. Ik heb er alle vertrouwen in dat zij en hun medewerkers dit wetenschapsgebied tot verdere bloei zullen brengen. De omstandighe-

den daarvoor zijn gunstig. Door inspanningen van velen is er aan de KUN een unieke combinatie van NMR Faciliteiten ontstaan. Naast de biomoleculaire en vaste stof NMR in onze Faculteit zijn in de Faculteit Medische Wetenschappen de bloeiende onderzoeksgroepen van Professor Arend Heerschap en Professor Jelle Barents actief op het gebied van *in vivo* NMR en heeft Professor Ron Wever de NMR spectroscopie ontwikkeld tot een krachtig middel voor de bestudering van lichaamsvloeistoffen. Verder is in het nieuwe Centrum voor Cognitiewetenschappen een NMR-groep gestart onder leiding van Professor Norris, die zal werken aan cognitieproblemen. Ongetwijfeld zal door wederzijdse ondersteuning en kruisbestuiving interessante en belangrijke nieuwe wetenschap worden gedaan.

Een heugelijke gebeurtenis in onze Faculteit is het gereedkomen van het laboratorium voor onderzoek in hoge magneetvelden. De nieuwe generatie magneten die daar wordt geïnstalleerd belooft belangrijke nieuwe mogelijkheden voor de NMR spectroscopie, op het ogenblik speciaal voor de vaste stof NMR.

Daarnaast verwacht ik ook veel van een verdergaande samenwerking met het Nijmeegs Instituut voor Moleculaire Levenswetenschappen. Dr. Geerten Vuister en Dr. Hans Heus hebben hiervoor al een basis gelegd.

Dames en heren het is een optimistisch toekomstbeeld dat ik heb beschreven en terecht. De condities voor goed en vruchtbaar onderzoek zijn aanwezig. Dit is echter maar een deel van de algemene situatie. Hoewel sommige landelijke statistieken een constante financiering van het onderzoek, berekend op basis van het bruto nationaal product en een toenemende stroom van bètastudenten tonen, zullen velen binnen de universiteit zich hierin niet herkennen.

In het algemeen is gedurende de laatste jaren binnen de bèta-faculteiten het aantal studenten juist drastisch afgenomen. Bovendien is door de voortdurende bezuinigingen door de overheid een stadium bereikt waarin een volgende bezuinigingsronde voor veel plaatsen binnen de universiteit weleens het spreekwoordelijke strootje zou kunnen zijn dat de rug van de kameel doet breken. Gezien de financiële situatie van de universiteiten is er daarom alle reden voor NWO om het systeem van financiële matching door de universiteiten van door NWO gesubsidieerde onderzoeksprojecten of programma's te heroverwegen.

Dit wordt onderbouwd door andere, deze week gepubliceerde cijfers, waaruit blijkt dat de Nederlandse bestedingen aan onderwijs, berekend op het bruto nationaal product 20% lager zijn dan het Europees gemiddelde, dus 30% lager dan de landen die het goed doen. Wij zijn vergelijkbaar met Tsjechië en in de ranglijst bevinden we ons niet ver boven Turkije.

Daarnaast ziet men in toenemende mate dat een sturing van het onderzoek van bovenaf plaats vindt. Deze top down benadering is het verst doorgeschoten in de kaderprogramma's van de EEG, maar ook in onze landelijke wetenschapsfinanciering is dit een probleem geworden. Dat het in de Europese context ook anders kan moge blijken uit de wijze waarop EMBO, de European Molecular Biology Organization, en haar succesvolle laboratorium EMBL wordt gefinancierd. Ook Nederland had een uitstekende naam op het gebied van wetenschapsfinanciering waarbij een goed evenwicht tussen top down en bottom up initiatieven bestond. In "The Scientific Wealth of Nations" een rapport dat een paar jaar geleden in het bekende wetenschappelijke tijdschrift Science werd gepubliceerd, behoorde Nederland, op basis van kwaliteit van het bètaonderzoek, tot de zes toplanden van de wereld, terwijl het

percentage van het bruto nationaal product besteed aan onderzoek het laagst was vergeleken met de andere landen uit deze groep. De Nederlandse overheid kreeg dus waar voor haar geld.

De toenemende top down benadering met de daaraan gekoppelde toenemende bureaucrativering en gevaar van betutteling van onderzoekers biedt geen waarborg voor een betere besteding van belastinggelden. Overigens moet ook de universiteit op haar hoede zijn voor een steeds grotere betutteling van haar docenten zoals via een overmatige structurering van het onderwijs, waarbij bijvoorbeeld precies wordt voorgeschreven hoe lang een tentamen behorend bij een driepuntscollege mag duren. De universiteit kan alleen de beste mensen aantrekken en behouden wanneer die voldoende vrijheid en vertrouwen genieten, zodat zij er hun creativiteit kwijt kunnen. In zo'n universiteit heb ik mogen werken en ik hoop dat dit ook zo zal zijn voor degenen die na mij komen.

Dankwoord

Tenslotte wil ik, aan het eind gekomen van deze voordracht enige woorden van dank uitspreken. Een aantal mensen, die ik al eerder heb genoemd ben ik bijzondere dank verschuldigd. Zij zijn op verschillende momenten mede bepalend geweest voor de richting die ik ben gegaan. Professor Cor MacLean, die voor een groot deel van mijn wetenschappelijke vorming heeft zorg gedragen en die er op toezag dat ik op tijd thuis was als mijn vrouw moest bevallen. Professor Robert Shulman die mij heeft geïntroduceerd in de biomoleculaire NMR en mij kennis liet maken met een aantal boeiende aspecten van Amerikaanse wetenschapsbeoefening.

Een speciaal woord van dank wil ik ook richten aan de Stichting Scheikundig Onderzoek Nederland, beter bekend als de Stichting SON en tegenwoordig bekend onder de naam CW (Chemische Wetenschappen), een onderdeel van NWO dat het chemisch onderzoek in Nederland coördineert en bevordert. Hun jarenlange ondersteuning van de NMR faciliteiten in Nederland, waaronder die in Nijmegen, hebben het mogelijk gemaakt dat de Nederlandse NMR spectroscopie internationaal een belangrijke rol kon spelen. Tevens wil ik SON en CW bedanken voor hun ondersteuning en participatie in het Nijmegen SON Research Centrum, het NSR Centrum, een onderzoeksinstituut opgericht door de Stichting SON en de Nijmeegse Universiteit. Dit centrum heeft op essentiële wijze bijgedragen aan de kwaliteit van het Nijmeegs chemisch onderzoek. Het was tevens een onderzoeksschool avant la lettre en dit heeft er toe bijgedragen dat ze al in de eerste ronde de officiële erkenning van de KNAW verwierf. Voor het belangrijke aandeel dat de coördinator van de school, Dr. Ben Harmsen, hierin heeft geleverd ben ik hem zeer erkentelijk.

Het bestuur van deze Universiteit en van de Faculteit Natuurwetenschappen, Wiskunde en Informatica ben ik dankbaar voor het vertrouwen dat zij mij gedurende de jaren hebben geschonken. Met velen van U heb ik kortere of langere tijd samengewerkt. Speciaal wil ik hier noemen de rectores Professor Plasschaert en Professor v.d. Elst, die nauw betrokken waren bij het reilen en zeilen van het NSR centrum.

Dames en Heren, de Nijmeegse bètafaculteit is relatief jong en beperkt in omvang vergeleken met andere bètafaculteiten. Door de uitstekende collegiale verhoudingen en de bereidheid tot samenwerking is

het gelukt Nijmegen op de wereldkaart te zetten en ik ben dankbaar dat ik in deze omgeving heb mogen werken. Mijn bijdragen daaraan waren niet mogelijk geweest zonder de steun van velen van U. Een bijzondere rol daarin hebben Professor Bert de Boer en Professor Binne Zwanenburg vervuld. Op hun geheel eigen karakteristieke manier hebben zij mij altijd gesteund. In de laatste jaren heb ik veel aandacht besteed aan de fusie tussen de zojuist genoemde NSR onderzoekschool en het RIM, het Research Instituut voor Materialen, een tevens door de KNAW erkende onderzoekschool ressorterend onder de subfaculteit Natuurkunde. Dit is mij wat zwaarder gevallen dan ik had gedacht. Er zijn bepaalde cultuurverschillen tussen de fysici en de chemici die men niet eenvoudigweg onder het kleed kan veegen. Ik denk echter dat in de laatste jaren vooral met de steun van de hoogleraren Theo Rasing, Jan-Kees Maan en Roeland Nolte, deze verschillen zijn omgezet in een positieve kracht, die al heeft geresulteerd in de formele erkenning van het nieuwe NSRIM als KNAW onderzoekschool. De bijdragen van Dr. Sacco ter Lintel als coördinator van het NSRIM zijn hierbij onmisbaar geweest. Alle ingrediënten zijn aanwezig om er een groot succes van te maken.

Al de activiteiten en resultaten die ik hiervoor heb beschreven konden alleen maar tot stand komen dank zij de medewerking en inzet van de medewerkers en niet te vergeten de studenten van de afdeling. De meesten van U hebben zich altijd ingezet beyond the call of duty, vaak resulterend in niet opgemaakte vakantiedagen. U zult mij vergeven wanneer ik U niet allen bij naam noem, maar wel voor drie personen een uitzondering maak. Op de eerste plaats mevrouw Babs Klink, de vraagbaak en hulp voor iedereen, bekend binnen de hele universiteit

en ver, zeer ver daarbuiten. Babs bedankt voor alles ook namens al onze buitenlandse gasten die je altijd met zoveel zorg hebt omringd. De tweede spil van de afdeling was de heer John Roef. Hij zorgde ervoor dat iedereen op tijd zijn spullen kreeg, dat de financiën op orde bleven en iedereen met veel humor op zijn plaats werd gezet als dat nodig was. Als derde wil ik noemen de heer Harry Koster, die met veel verve de taken van John Roef heeft overgenomen en zich via zijn aanpak een heel speciale plaats binnen de biofysische chemie en de vaste stof NMR heeft verworven.

Ten slotte lieve Riet en kinderen voor jullie het laatste woord. Het leven te delen met een wetenschapper en hoogleraar valt niet altijd mee. Soms kwam ik tamelijk onwelriekend thuis van een organisch practicum en kon ik beter aan de waslijn gehangen worden, soms was ik niet aanspreekbaar als er weer iets op tijd moest worden afgemaakt of er een belangrijke proef was mislukt en soms was ik gewoon weg als er weer het zoveelste congres was. Gelukkig hebben jullie het met mij uitgehouden. Riet jij hebt gezorgd dat ik altijd in een geweldig thuis kwam en daar ben ik je heel dankbaar voor. Wij hebben elkaar al in het Shell Laboratorium leren kennen en hoewel onze relatie van daarna is zijn we denk ik toch een oliestelletje en jij hebt het licht altijd brandend gehouden.

Ik heb gezegd.

Referenties

1. Findlay, A. and Williams, T. (1965) "A hundred years of Chemistry", Methuen & Co, London.
2. Lucretius (Titus Lucretius Carus) (~ 55 BC) "De rerum natura", Vertaling: W.H.D. Rouse and M.F. Smith (1997) Harvard University Press, Cambridge MA.
3. Kékulé, A. (1861) "Lehrbuch der Organischen Chemie oder der Chemie der Kohlenstoffverbindungen I", Enke, Erlangen.
4. Bloch, F. Hansen, W.W. and Packard, M. (1946) Phys. Rev. 69, 127.
5. Purcell, E.M., Torrey, H.C. and Pound, R.V., (1946) Phys. Rev. 69, 37.
6. Mackor, E.L. and MacLean, C. (1966) J. Chem. Phys. 44, 64.
7. Rodrigues de Miranda, J.F. and Hilbers, C.W. (1975) J. Magn. Res. 19, 11.
8. Shulman, R.G., Hilbers, C.W., Kearns, D.R., Reid, B.R. and Wong, P.W. (1973) J. Mol. Biol. 78, 57
9. Crothers, D.M., Cole, P.E., Hilbers, C.W. and Shulman, R.G. (1974) J. Mol. Biol. 87, 63.
10. Patel, D.J. and Hilbers, C.W. (1975) Biochemistry, 14, 2651.
11. Van de Ven, F.J.M. and Hilbers, C.W. (1986) J. Mol. Biol. 192, 419.
12. Van de Ven, F.J.M. and Hilbers, C.W. (1983) J. Mag. Res. 54, 512.
13. Kolk, M., van der Graaf, M., Wijmenga, S.S., Pleij, C.W.A., Heus, H.A. and Hilbers, C.W. (1998) Science, 280, 434.
14. Alma, N.C.M., Harmsen, B.J.M., de Jong, E.A.M., van de Ven, J. and Hilbers, C.W. (1983) J. Mol. Biol. 163, 47.
15. Folkers, P.J.M., Nilges, M., Folmer, R.H.A., Konings, R.H.N. and Hilbers, C.W. (1994) J. Mol. Biol. 236, 229.

16. Folmer, R.H.A., Nilges, M., Konings, R.N.H. and Hilbers, C.W. (1995) EMBO J. 14, 4132.
17. Horstink, L.M., Abseher, R., Nilges, M. en Hilbers, C.W. (1999) J. Mol. Biol. 287, 569.